



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61K 37/02, 9/14, 47/18, 47/26 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/14465 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Juli 1994 (07.07.94) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/03543 | | (81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 15. December 1993 (15.12.93) | | | |
| (30) Prioritätsdaten: P 42 42 863.7 18. December 1992 (18.12.92) DE | | Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE). | | | |
| (72) Erfinder; und | | | |
| (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MICHAELIS, Uwe [DE/DE]; Puettrichstrasse 25, D-82362 Weilheim (DE). RUDOLPH, Rainer [DE/DE]; Faerbergasse 17, D-82362 Weilheim (DE). WINTER, Gerhard [DE/DE]; Jahnstrasse 20 E, D-69221 Dossenheim (DE). WOOG, Heinrich [DE/DE]; Lindenstrasse 6, D-69514 Landenbach (DE). | | | |
| (74) Anwälte: FOUQUET, Herbert usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE). | | | |
| (54) Title: STABLE LYOPHILIZED PHARMACEUTICAL PREPARATIONS G-CSF | | | |
| (54) Bezeichnung: STABILE LYOPHILISIERTE PHARMAZEUTISCHE ZUBEREITUNGEN VON G-CSF | | | |
| (57) Abstract | | | |
| The invention concerns lyophilized pharmaceutical preparations of G-CSF which contain maltose, raffinose, saccharose, trehalose or aminosugar as stabilizers. In addition, the invention concerns a method of preparing such stabilized lyophilizates and the use of maltose, raffinose, saccharose, trehalose or aminosugar as stabilizers of drugs containing G-CSF. | | | |
| (57) Zusammenfassung | | | |
| Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind lyophilisierte pharmazeutische Zubereitungen von G-CSF, die Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Aminosucker als Stabilisierungsmittel enthalten. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung dieser stabilisierten Lyophilisate, sowie die Verwendung von Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Aminosucker als Stabilisatoren von G-CSF-haltigen Arzneimitteln. | | | |

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|-------------------------------|
| AT | Österreich | GA | Gabon | MR | Mauritanien |
| AU | Australien | GB | Verinigtes Königreich | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GE | Georgien | NE | Niger |
| BE | Belgien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BJ | Benin | IE | Irland | PL | Polen |
| BR | Brasilien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BY | Belarus | JP | Japan | RO | Rumänien |
| CA | Kanada | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KG | Kirgistan | SD | Sudan |
| CG | Kongo | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CH | Schweiz | KR | Republik Korea | SI | Slowenien |
| CI | Côte d'Ivoire | KZ | Kasachstan | SK | Slowakei |
| CM | Kamerun | LI | Liechtenstein | SN | Senegal |
| CN | China | LK | Sri Lanka | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| ES | Spanien | MG | Madagaskar | US | Verenigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | ML | Mali | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MN | Mongolei | VN | Vietnam |

Stabile lyophilisierte pharmazeutische Zubereitungen von G-CSF

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind lyophilisierte pharmazeutische Zubereitungen von G-CSF, die Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Aminosucker als Stabilisierungsmittel enthalten. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung dieser stabilisierten Lyophilisate sowie die Verwendung von Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Aminosucker als Stabilisatoren von G-CSF-haltigen Arzneimitteln.

Verschiedene pharmazeutische Zubereitungen, die G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) enthalten, sind bereits aus dem Stand der Technik bekannt.

In DE 37 23 781 (GB 2,193,631) wird ein G-CSF-haltiges Arzneimittel beschrieben, das zur Stabilisierung von G-CSF mindestens ein pharmazeutisches grenzflächenaktives Mittel, Saccharid, Protein oder eine hochmolekulare Verbindung enthält. Es werden dort Zubereitungen vorgeschlagen, die Humanserumalbumin als stabilisierendes Mittel enthalten. Als vorteilhaft werden insbesondere Zubereitungen genannt, die oberflächenaktive Mittel in Gewichtsanteilen enthalten, die dem 1- bis 10 000fachen der eingesetzten G-CSF-Menge entsprechen.

In EP 0 373 679 werden stabilisierte Zubereitungen von GCSF beschrieben, die sich im wesentlichen durch einen sauren pHWert der Lösung auszeichnen, wobei die Lösungen eine möglichst geringe Leitfähigkeit aufweisen sollten. Die Lösungen besitzen einen pH-Wert von 3 - 3,7, falls die Lösungen weitere pharmazeutische Hilfsstoffe, wie beispielsweise Puffer oder Mannitol, enthalten. Für den Fall, daß keine Puffersubstanzen in der Arzneiform vorhanden sind, werden pH- Bereiche von 2,75 - 4 als vorteilhaft beschrieben.

Weiterhin werden in EP 0 306 824 stabilisierte Lyophilisate von Humanprotein-Präparaten beschrieben, bei denen die Stabilisierung durch Zusatz eines Gemisches von Harnstoff, Aminosäuren und Detergenz erfolgt.

In der früheren PCT-Patentanmeldung PCT/EP92/01823 wird ein Verfahren zur Herstellung von G-CSF-haltigen, gut verträglichen Arzneimitteln für Infusions- oder Injektionszwecke beschrieben. Die flüssigen Darreichungsformen zeichnen sich insbesondere durch eine geringe Titrationsacidität und geringe Pufferkapazität aus. Die pH-Werte der beschriebenen G-CSF-haltigen Infusions- und Injektionslösungen liegen im sauren Bereich von etwa 3,8 - 4,5.

Verfahren zur Herstellung von G-CSF-haltigen flüssigen Arzneiformen, die zusätzlich Konservierungsmittel enthalten, sind bekannt aus PCT/EP92/01822. Die pH-Werte der wässrigen pharmazeutischen Lösungen liegen im sauren Bereich von 2,5 - 4,5. Die Stabilisierung von G-CSF wird dort im wesentlichen durch die Einstellung des für G-CSF günstigen sauren pH-Wertes und durch Zugabe einer Mischung von verschiedenen Aminosäuren erreicht.

Die bisher bekannten Arzneiformen für G-CSF besitzen jedoch einige Nachteile. Es wurde festgestellt, daß flüssige GCSF-Zubereitungen gegenüber Einfrieren und Auftauen in einigen Fällen empfindlich sein können. Das unkontrollierte Einfrieren und Wiederauftauen derartiger Zubereitungen kann zur Entstehung von Dimeren, Oligomeren und Aggregaten führen, ggf. können auch unlösliche Präzipitate hervorgerufen werden. Derartige Eigenschaften von Proteinarzneimitteln sind aus medizinisch-pharmazeutischer Sicht bedenklich, da ein versehentliches Einfrieren der pharmazeutischen Lösung nicht mit Sicherheit vermieden werden kann, und somit das Risiko der Applikation einer qualitativ veränderten Zubereitung besteht.

Nachteilig bei den in DE 37 23 781 beschriebenen Zubereitungen ist ferner die Tatsache, daß diese pharmazeutische Zusatz- oder Hilfsstoffe enthalten, die aus medizinischer Sicht nicht ohne weiteres als unbedenklich einzustufen sind. Polymere und Proteine besitzen im Hinblick auf ihre Eignung als pharmazeutische Zusatzstoffe aufgrund ihrer Herkunft und physikalisch-chemischen Eigenschaften ein gewisses Risikopotential. Proteine menschlichen oder tierischen Ursprungs sowie aus Zellkulturen gewonnene Proteine tragen ein potentiell Restrisiko viraler Verunreinigungen. Auch andere, analytisch schwer nachweisbare proteinartige Verunreini-

gungen können wegen ihrer antigenen Eigenschaften immunologische Reaktionen beim Menschen hervorrufen. Proteine tierischen Ursprungs können darüber hinaus generell aufgrund ihrer spezie-spezifischen Eigenschaften immunologische Reaktionen beim Menschen auslösen. Auch Langzeitreaktionen nach späterer Reapplikation derartiger Proteine sind möglich.

Der Zusatz von hochmolekularen Verbindungen (Polymere) kann ebenfalls problematisch sein. Polymere sind aufgrund ihrer großen Molekülmasse im Körper akkumulierbar und können somit, falls kein Bioabbau erfolgt, über lange Zeit im Körper verbleiben. Dies ist besonders bei subkutaner Applikation zu befürchten, da der Abtransport und die Verteilung durch den Blutstrom gegenüber intravenöser Gabe stark verlangsamt erfolgt. In Abhängigkeit von der Molmasse können Polymere auch antigene Eigenschaften aufweisen. Auch ist die Reinheit von Polymeren aufgrund der zur Herstellung verwendeten Katalysatoren oder des Vorhandenseins von Monomeren und anderen Polymerbruchstücken schwierig zu gewährleisten. Der Einsatz von Polymeren bei pharmazeutischen Darreichungsformen, insbesondere bei subkutan applizierbaren Arzneiformen ist somit, wenn möglich, zu vermeiden.

Die in DE 37 23 781 beschriebenen Tensidmengen sind aus medizinischer Sicht ebenfalls als problematisch anzusehen. Dort werden Tensidkonzentrationen als vorteilhaft beschrieben, die bezüglich der Gewichtsanteile von G-CSF 1- bis 10 000 Gewichtsanteile eines oberflächenaktiven Mittels enthalten. Betrachtet man andererseits die für den klinischen Gebrauch bevorzugten Anwendungskonzentrationen von G-CSF von 0,05 - 1,5mg/ml in den fertigen Arzneiformen, so ergeben sich entsprechend hohe Tensidkonzentrationen. Diese sind aus medizinischer Sicht zu vermeiden, da sie lokale Irritationen auslösen können.

Außerdem haben einige der bekannten Formulierungen den Nachteil, daß sie aufgrund des angewandten niedrigen pH-Wertes insbesondere bei subkutaner Anwendung zu lokalen Unverträglichkeiten beim Patienten führen. Das erhaltene Produkt kann bei empfindlichen Patienten zu Schmerzen und lokaler Gewebereizung führen,

da der im Gewebe physiologisch vorliegende Bereich von pH 7,0 - 7,5 nicht eingehalten wird.

Aus der Literatur ist ferner bekannt, daß insbesondere nichtglykosilierte Formen von G-CSF gegenüber glykosiliertem G-CSF, das aus CHO-Cellen gewonnen wird, besonders instabil sind (J. Biol. Chem. 1990, 265, 11432). Die Stabilisierung von nicht-glykosilierten Formen von G-CSF erwies sich als besonders schwierig und bedarf speziell ausgewählter Maßnahmen, um dieses Molekül in einer stabilen Arzneiform zu formulieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine Arzneiform für G-CSF zur Verfügung zu stellen, die eine ordnungsgemäße Anwendung von G-CSF als Arzneimittel ermöglicht und die oben beschriebenen Nachteile der bisher bekannten Arzneiformen nicht aufweist. Die pharmazeutische Zubereitung sollte sowohl stabil gegenüber unkontrollierten Einfrier- und Auftauvorgängen als auch stabil bei längerer Lagerung als Lyophilisat sein, physiologisch gut verträglich, einfach handhabbar und exakt dosierbar sein.

Die in DE 37 23 781 beschriebenen Beispiele zeigen, daß stabile Lyophilisate erhalten werden können, wenn Humanserumalbumin als Hilfsstoff eingesetzt wird. Der Zusatz von Zuckeralkoholen allein führt zu weniger stabilen Formulierungen. Es ist deshalb im Sinne einer Verbesserung des Standes der Technik wünschenswert, Formulierungen zu finden, die kein Humanserumalbumin (HSA) oder andere Proteine oder Polymere enthalten und dennoch gute Stabilität auch bei erhöhter Temperatur aufweisen. Der Verzicht auf Humanserumalbumin und Polymere vermindert das medizinische Risiko von Nebenwirkungen, wie sie beispielsweise für HSA beschrieben sind.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß man im Sinne der vorliegenden Erfindung stabile pharmazeutische Arzneiformen herstellen kann, wenn man als Zusatzstoffe Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Aminozucker einsetzt.

Feste Zubereitungen, die Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Amino-
zucker als Hilfsstoffe enthalten, können ohne nennenswerten Qualitätsverlust des
Proteins eingefroren oder auch bei erhöhten Temperaturen (bis 40 °C) gelagert
werden. Die pharmazeutische Qualität des Wirkstoffes wird hierdurch nicht negativ
beeinflusst. Die erfindungsgemäßen Zubereitungen werden vorzugsweise als Lyo-
philisate in den Handel gebracht. Die nach Redissolution hergestellten wässrigen
Zubereitungen sind sehr gut verträglich, und stellen hinsichtlich der Proteinstabilität
qualitativ hochwertige Zubereitungen dar. Sie haben außerdem den Vorteil, daß
durch den Zusatz von Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Amino-
zuckern als Hilfsstoffe Lösungen mit einem vorteilhaften pH-Wert von 4 - 5 oder
7 - 8 hergestellt werden können, während die aus dem Stand der Technik bekann-
ten Lösungen aus Stabilitätsgründen des Proteins hauptsächlich Lösungen mit
einem pH- Wert von 2,5 - 3,5 erforderlich machten.

Die erfindungsgemäßen Zubereitungen besitzen außerdem den Vorteil, daß sie
im wesentlichen frei von proteinartigen oder polymeren Hilfsstoffen sind, deren Ver-
wendung aus medizinischer Sicht nicht unproblematisch sein kann. Aufgrund der
Tatsache, daß nunmehr durch Auflösen von Lyophilisaten erhaltene, flüssige
G-CSF-haltige Arzneiformen mit einem pH-Wert von etwa 4 - 5 oder 7 - 8, vorzugs-
weise mit einem pH-Wert in der Nähe des pH-Wertes des Blutes (pH 7,2 - 7,4),
hergestellt werden können, besitzen sie ferner den Vorteil, gut verträglich und
weitgehend schmerzfrei applizierbar zu sein. Dies ist vor allem bei subkutaner Gabe
wesentlich, da hier leichter Unverträglichkeiten entstehen als bei intravenöser Gabe.
Die erfindungsgemäßen Zubereitungen lassen sich auch in den klinisch besonders
bevorzugten Konzentrationsbereichen von 0,05 - 1,5 mg/ml herstellen, so daß
Injektionsvolumina von $\leq 1,0$ ml eingehalten werden können. Kleine Injektions-
volumen sind bei subkutaner Applikation besonders vorteilhaft, da sie nur geringe
mechanische Reize im Unterhautgewebe hervorrufen.

Vorteilhaft ist ferner, daß aufgrund der gewählten Hilfsstoffe die bisher benötigten
relativ hohen Tensidmengen in den flüssigen Arzneiformen nicht mehr erforderlich
sind. Vielmehr sind niedrige Tensidmengen von 0,5 mg/ml oder weniger, vorzugs-

weise von 0,01 - 0,1 mg/ml, ausreichend zur Stabilisierung von G-CSF. Vorteilhaft können Tensidkonzentrationen (mg/ml) verwendet werden, die kleiner als oder maximal gleich der eingesetzten Proteinmenge an G-CSF pro Volumeneinheit (mg/ml) sind. Dies ist vor allem bei solchen flüssigen Arzneiformen von Vorteil, die für die subkutane Anwendung von G-CSF bestimmt sind. Außerdem werden durch die erfindungsgemäßen Maßnahmen insbesondere die labilen, unglykosilierten G-CSF-Moleküle für pharmazeutische Zubereitungen ausreichend stabilisiert.

Der Hilfsstoff Maltose (Malzzucker, Maltobiose, 4-O-alpha-D-Glucopyranosyl-D-glucose) wird in einer Menge der 0,01 - 10 000fachen Menge des Wirkstoffes G-CSF eingesetzt. Das Gleiche gilt für die Hilfsstoffe Raffinose, Saccharose und Trehalose. Die Konzentration dieser Hilfsstoffe in der flüssigen Arzneiform beträgt 0,1 - 200 mg/ml, vorzugsweise 10 - 60 mg/ml. Anstatt von Maltose können auch die stereoisomeren Disaccharide Cellobiose, Gentiobiose oder Isomaltose eingesetzt werden. Als Aminozucker werden generell solche Monosaccharide bezeichnet, die anstelle einer Hydroxygruppe eine Amino- oder eine acylierte Aminogruppe besitzen. Beispiele hierfür sind Glucosamin, Galactosamin, Neuraminsäure.

In einer besonderen Ausführungsform werden pharmazeutische Zubereitungen zur Verfügung gestellt, die neben Maltose, Raffinose, Saccharose oder Trehalose ferner Aminosäuren enthalten. Insbesondere kommen als Aminosäuren basische Aminosäuren in Frage, wie beispielsweise Arginin, Lysin, Ornithin, u.a., saure Aminosäuren, wie beispielsweise Glutaminsäure, Asparaginsäure, u.a. oder auch aromatische Aminosäuren, wie beispielsweise Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, u.a. .

Aminosäuren werden in einer 0,01 - 10 000fachen Menge des Wirkstoffes G-CSF eingesetzt. Die Konzentration dieser Hilfsstoffe in der flüssigen Arzneiform beträgt 0,1 - 200 mg/ml, vorzugsweise 1 - 50 mg/ml.

Zur Herstellung der Lyophilisate werden zunächst die wässrigen pharmazeutischen Lösungen hergestellt, die den Wirkstoff und andere pharmazeutische übliche Hilfs-

stoffe enthalten. Als pharmazeutische Hilfsstoffe kommen insbesondere Aminosäuren, wie z. B. Arginin, Lysin, Ornithin, Phenylalanin oder Tyrosin in Frage. Außerdem kann die wässrige Zubereitung übliche Puffersubstanzen, wie z. B. Essigsäure, Salzsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Weinsäure, Maleinsäure und Phosphorsäure oder deren physiologisch verträglichen Salze enthalten. Bei der Herstellung der Hilfsstofflösung können diese Puffersubstanzen entweder in Form der entsprechenden freien Säure oder in Form der Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalze vorgegeben werden. Außerdem kann die Lösung weitere pharmazeutisch übliche Hilfsstoffe bereits enthalten.

Die Reihenfolge der Zugabe der verschiedenen Hilfsstoffe oder des Wirkstoffes ist weitgehend unabhängig hinsichtlich des Herstellungsverfahrens und liegt im Ermessen des Fachmannes. Der gewünschte pH-Wert der Lösung wird durch Zugabe von Basen, wie beispielsweise von Alkalihydroxiden, Erdalkalihydroxiden oder Ammoniumhydroxid eingestellt. Vorzugsweise wird hierzu Natriumhydroxid verwendet. Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes ist prinzipiell durch Zugabe von basischen Lösungen möglich. In diesem Sinne kommen allgemein Salze von starken Basen mit schwachen Säuren in Frage, wie z. B. Natriumacetat, Natriumcitrat, Di-Natrium- bzw. Di-Kaliumhydrogenphosphat oder Natriumcarbonat. Für den Fall, daß die pharmazeutische Hilfsstofflösung einen basischen pH-Wert aufweist, erfolgt die Einstellung durch Titration mit Säure, bis der gewünschte pH-Bereich erreicht ist. Als Säuren kommen physiologisch verträgliche anorganische oder organische Säuren in Frage, wie beispielsweise Salzsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Zitronensäure oder allgemein übliche Lösungen von Substanzen, die einen sauren pH-Wert besitzen. Bevorzugte Substanzen sind in diesem Sinne Salze von starken Säuren mit schwachen Basen, wie z. B. Natriumdihydrogenphosphat oder Kaliumdihydrogenphosphat.

Die Konzentrationen der Puffersubstanzen in der fertig applizierbaren flüssigen Arzneiform betragen jeweils etwa 2 - 80 mMol/l. Die Gesamtkonzentration an Puffersubstanzen sollte einen Wert von 100 mMol/l nicht übersteigen. Bevorzugt beträgt die Konzentration der Puffersubstanzen 5 - 40 mMol/l.

Die mittels der genannten Hilfsstoffe erfolgte Stabilisierung von G-CSF-Molekülen bezieht sich prinzipiell auf alle durch rekombinante Verfahren hergestellte G-CSF-Moleküle und deren Varianten. Der Begriff G-CSF oder G-CSF-Variante gemäß vorliegender Erfindung beinhaltet alle natürlich vorkommenden Varianten von G-CSF, sowie davon abgeleitete durch rekombinante DNA-Technologie modifizierten GCSF-Proteine, insbesondere Fusionsproteine, die neben dem GCSF-Anteil noch andere Proteinsequenzen enthalten. Besonders bevorzugt ist in diesem Sinne G-CSF-Mutein mit einem N-terminalen Met-Rest an Position - 1, das zur Expression in prokaryontischen Zellen geeignet ist. Ebenso geeignet ist eine rekombinante Methionin-freie G-CSF-Variante, die gemäß PCT/EP91/00192 hergestellt werden kann. Unter dem Begriff "GCSF-Variante" werden solche GCSF-Moleküle verstanden, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt sein können, wobei die wesentlichen Eigenschaften von G-CSF weitgehend erhalten bleiben. Geeignete G-CSF-Muteine sind beispielsweise in EP0 456 200 beschrieben.

Zur Herstellung gut verträglicher parenteraler Arzneiformen ist der Zusatz von isotonisierenden Hilfsstoffen zweckmäßig, wenn nicht durch die osmotischen Eigenschaften des Wirkstoffes und der zur Stabilisierung eingesetzten Hilfsstoffe bereits Isotonie erreicht werden kann. Dazu werden vor allem nicht-ionisierte, gut verträgliche Hilfsstoffe eingesetzt.

Der Zusatz von Salzen ist zur Einstellung der Isotonie nicht vorteilhaft, da hohe Salz- oder Ionenkonzentrationen die Aggregatbildung von G-CSF fördern. Vorteilhaft werden deshalb Salze in geringer Menge zugesetzt.

Außerdem können die pharmazeutischen Zubereitungen weitere übliche Hilfs- oder Zusatzstoffe enthalten. Es können Antioxidanzien, wie beispielsweise Glutathion oder Ascorbinsäure oder ähnliche Substanzen, chaotrope Hilfsstoffe, wie beispielsweise Harnstoff, und Aminosäuren, wie beispielsweise Arginin, Lysin, Ornithin, Glutaminsäure und andere zugesetzt werden.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von repräsentativen Ausführungsbeispielen näher beschrieben:

Die Beispiele 1 - 14 zeigen, in welcher Weise erfindungsgemäße Lyophilisate formuliert, hergestellt und hinsichtlich der Stabilität des Proteins näher untersucht werden können. Der Einfluß der neben Maltose, Raffinose, Saccharose oder Trehalose zugesetzten Hilfsstoffe sowie des pH-Wertes wird erläutert.

Vergleichende Untersuchungen zu auf der Basis von Mannit oder Glycin hergestellten Lyophilisaten zeigen, daß Maltose-, Raffinose-, Saccharose- oder Trehalose-Lyophilisate signifikant bessere Ergebnisse liefern, als die mit anderen Gerüstbildnern hergestellten Zubereitungen. Durch Einsatz der erfindungsgemäß beschriebenen und in den Beispielen erläuterten Lyophilisate läßt sich im Sinne der beschriebenen Zielsetzung eine optimale Formulierung herstellen, die einen physiologisch verträglichen pH-Wert aufweist, langfristig lagerstabil ist und dabei erhöhte Lagertemperaturen sowie mechanischen Streß ohne negative Auswirkungen auf das Protein aushält. Die Zubereitungen sind insbesondere gegen Einfrieren unempfindlich und auf die als kritisch angesehenen Hilfsstoffe, wie beispielsweise Proteine oder Polymere, kann völlig verzichtet werden. Außerdem sind nur relativ geringe Mengen an physiologisch gut verträglichen Tensiden enthalten.

In Beispiel 3 werden verschiedene Zucker oder Zuckeralkohole auf ihre stabilisierende Wirkung in G-CSF-Lyophilisaten untersucht. Maltose zeigt sich gegenüber Lactose und Mannit vorteilhaft.

In Beispiel 4 werden Lyophilisate mit Maltose und weiteren Hilfsstoffen beschrieben. Die Ergebnisse belegen klar, daß der Zusatz von Tensid die Stabilität der Zubereitung nicht wesentlich beeinflusst, jedoch die Anhaftung des Proteins an Oberflächen und damit mögliche Gehaltsverluste verhindert. Die Anwesenheit von Tensid ist somit in derartigen Rezepturen nicht aus Gründen der Stabilisierung, sondern zur Aufrechterhaltung der Nenndosierung erforderlich.

In Beispiel 5 werden verschiedene Maltose-haltige Lyophilisat-Rezepturen verglichen mit zwei ansonsten gleichartig formulierten Lyophilisaten ohne Maltose. Aus den Daten ist klar erkennbar, daß die Anwesenheit von Maltose in den untersuchten Parametern vorteilhaft im Sinne der Stabilität der Zubereitung wirkt. Der Zusatz weiterer Hilfsstoffe, wie Ascorbinsäure, Glutathion, Glutaminsäure zeigt im Rahmen der untersuchten Lagertemperaturen und Lagerzeiten keinen signifikanten Einfluß auf die Stabilität. Die in Beispiel 5 beschriebenen Zubereitungen zeichnen sich insbesondere dadurch aus, daß sie bei langfristiger Lagerung bei erhöhter Temperatur keine Veränderungen in den untersuchten Qualitätsmerkmalen aufweisen.

Aus den Beispielen ist weiterhin ersichtlich, daß in Lyophilisaten, die Maltose und Arginin enthalten, ein weiteres Puffersalz nicht unbedingt erforderlich ist, da der bei pH-Einstellung durch Salzsäure, Phosphorsäure, Zitronensäure oder anderen Säuren entstehende Argininpuffer ausreichend pH-stabilisierend wirkt. Argininpuffer ist hervorragend geeignet, stabile Zubereitungen im pH-Bereich unter 5,0 und von 7,0 - 7,5 zu formulieren (siehe Beispiele 11 und 12). Beispiel 9 zeigt, daß wiederaufgelöste Lyophilisate mit pH 7,4, die Maltose und Argininpuffer enthalten, mindestens 24 Stunden haltbar sind.

In Beispiel 6 werden G-CSF-Lyophilisate beschrieben, die Aminosucker (Galactosamin, N-Methylglucosamin) enthalten. Es ist erkennbar, daß die Kombination von Maltose und Aminosucker stabilere Zubereitungen ergibt als die Kombination von Glycin mit Aminosuckern. Damit wird belegt, daß Maltose in Kombination mit physiologisch gut verträglichen Hilfsstoffen deutlich stabilere und damit bezüglich der pharmazeutischen Qualität hochwertigere Lyophilisate von G-CSF liefert als andere, in der Literatur vorgeschlagene Gerüstbildner und Stabilisatoren.

In Beispiel 7 wird gezeigt, daß G-CSF in Maltose-haltigen Lyophilisaten deutlich stabiler als in Mannit-haltigen Lyophilisaten ist. Dies wird bei relevanten Lagertemperaturen und langen Lagerzeiten entsprechend belegt.

In Beispiel 8 wird gezeigt, daß Maltose-haltige Lyophilisate bei verschiedenen pH-Werten sowie bei verschiedenen Hilfsstoffzusätzen vorteilhafte Ergebnisse gegenüber Lyophilisaten mit anderen Gerüstbildnern und Stabilisatoren (Zuckeralkoholen, Aminosäuren) erbringen.

Beispiel 10 belegt die Stabilität der erfindungsgemäßen Lyophilisate mit Maltose, Raffinose, Saccharose oder Trehalose nach 13-wöchiger Lagerung bei 40 °C.

Beispiel 11 zeigt, daß die erfindungsgemäßen Lyophilisate auch mit höheren G-CSF-Konzentrationen stabil sind, und in Beispiel 12 wird die Langzeitstabilität der erfindungsgemäßen Rezepturen selbst bei höheren Temperaturen belegt.

Beispiel 1:

Untersuchungsmethoden zur Stabilitätsbestimmung

Die lyophilisierten Zubereitungen wurden unter Lichtausschluß bei definierten Lagertemperaturen gelagert und danach mit reversed phase HPLC (RP-HPLC), Gelchromatographie oder size exclusion Chromatographie (SEC HPLC), Western Blot auf Proteinreinheit sowie das Auftreten von Aggregaten und Dimeren hin untersucht. Außerdem wurde der Proteingehalt durch OD 280-Photometrie, die Biologische Aktivität durch Bioassay (NFS 60-Zelltest), sowie Aggregation und Präzipitation durch Trübungsmessung untersucht. Die angewandten Methoden lassen sich wie folgt beschreiben:

1.1 Reversed phase HPLC

Die RP-HPLC erfolgte unter Verwendung einer Nucleosil C18- Säule (Fa. Knauer). Die mobile Phase bestand aus 0,12 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA)/Wasser (A) und 0,1 % (v/v) TFA/Ace- tonitril (B). Die Chromatographie

wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml/min unter Verwendung eines linearen Gradienten von A nach B durchgeführt.

Die Injektionsmenge betrug je nach Rezeptur 3 - 6 µg G-CSF. Die Auswertung erfolgte über die Peakfläche unter Verwendung eines externen Standards bei einer Wellenlänge von 214nm.

1.2 Size Exclusion Chromatographie (SEC)

Für die SE-Chromatographie wurde eine TSK G 2000 SW-Trennsäule (7,5 x 300 mm) verwendet. Die Trennungen erfolgten isokratisch bei Raumtemperatur und einer Flußrate von 0,6ml/min in einem Phosphatpuffer (22,2 mM Na₂HP0₄; 107,7mM KH₂PO₄; pH 6,2). Die Injektionsmenge betrug 3 - 6 µg G-CSF. Die Auswertung erfolgte über die Peakfläche unter Verwendung eines externen Standards bei einer Detektionswellenlänge von 214nm.

1.3 SDS-Page/Western Blot

3 µg rhG-CSF werden unter nichtreduzierenden Bedingungen auf ein 12prozentiges Polyacrylamid-SDS-Gel gegeben und der Gelelektrophorese unterzogen. Anschließend werden die nach ihrem Molekulargewicht getrennten G-CSF-Monomere, -Dimere oder -Aggregate durch Elektroblothing auf Nitrocellulose transferiert. Durch Inkubation mit einem spezifischen polyklonalen biotinylierten Anti-G-CSF-Antikörper (PAK < GCSF > IgG) werden die Proteinbanden identifiziert und mittels der Phosphatase-Technik unter Benutzung von Streptavidin-alkalischem Phosphatasekonjugat (SA-AP-Konjugat), 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitro Blue Tetrazolin (NBT) nachgewiesen. Die Bestimmung der prozentualen Monomeren-, Dimeren- bzw. Aggregatanteile erfolgt durch Laserdensitometrische Auswertung mit Hilfe einer rhG-CSF-Standardreihe.

1.4 NFS-60 Bioassay (biologische Wirksamkeit)

Die in vitro Aktivitätsbestimmung von G-CSF basiert auf der Messung von Zellzahlen in einer durch G-CSF stimulierten Zellkultur von NFS-60 Zellen.

Unter geeigneten Bedingungen kann die Dehydrogenase-Aktivität der Zellen mit der Konzentration an G-CSF im Medium korreliert werden. Es werden geeignete Verdünnungen der G-CSF Pufferlösung hergestellt, um einen einfach meßbaren Anstieg in der Dehydrogenase-Aktivität zu erhalten.

Die Messung der Aktivität erfolgt dann photometrisch bei 570 und 690 nm, gemessen wird die Reduktion des Tetrazolinium-Salzes MTT (gelb) zu Formazan (blau).

Die in vitro Aktivität von G-CSF wird berechnet, indem die Daten der Probe gegen Standard nach der Methode der parallelen Linie verglichen werden. Die Auswertung erfolgt gemäß den Anforderungen der Ph. Eur. (VIII, 13).

1.5 Streulichtmessung, Trübungsbestimmung

Die Messung erfolgt direkt an der unverdünnten Produktlösung in Glasküvetten (Durchmesser 2 cm). Das von der Flüssigkeit diffus abgelenkte Streulicht wird unter einem Winkel von 90 °C gemessen. Gemessen wird im Vergleich zu Formazin-Standard-Suspensionen nach DIN 38404C2, die Angabe der Werte erfolgt in TE/F. Die Messung erfolgt an einem geeigneten Trübungsphotometer, z. B. LTP 5 (Fa. Dr. Lange, Düsseldorf).

1.6 Photometrie OD 280 (Proteingehalt)

Das G-CSF-UV-Spektrum hat ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, das auf Seitenkettenchromophore wie Tryptophan-, Tyrosin- und Phenylalaninreste zurückzuführen ist. Die Messung erfolgt im Vergleich zu Placebo-Lösungen mittels:

- UV-Spectrophotometer
(z. B. Uvikon 810 P oder 941, Kontron Instruments)
- Semi-micro Quartz Küvetten, 500 µl, Schichtdicke: 1 cm
(z. B. Hellma, Suprasil, Cat. No. 104.002B-QS)

Beispiel 2:

Wässrige Lösungen von 0,1 mg/1 ml Poloxamer 118 sowie 50mg/ml der nachfolgend genannten Zucker bzw. Zuckeralkohole Mannit (Rezeptur 1), Lactose (Rezeptur 2) und Maltose (Rezeptur 3) wurden mit G-CSF in einer Konzentration von 70 µg/ml versetzt. Die Lösungen wurden nach Filtration durch einen sterilisierten 0,2 µm-Membranfilter in sterile Injektionsflaschen aus Glas der hydrolytischen Klasse I abgefüllt. Nach der Lyophilisation wurde mit sterilem Stickstoff belüftet und die zunächst lose aufgesetzten Stopfen wurden zum Verschließen der Lyophilisate unter aseptischen Bedingungen eingedrückt. Die Lyophilisate wurden verbördelt und unter Lichtausschluß 6 und 13 Wochen bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Danach wurde mit den nachfolgend beschriebenen Methoden die Stabilität der Zubereitung untersucht.

Tabelle 1a: Lagerung bei 20 °C

| | Lagerung 6 Wochen bei 20 °C | | | Lagerung 13 Wochen bei 20 °C | | |
|-----------------------|--------------------------------|--------|------|---------------------------------|--------|-------|
| | I | II | III | I | II | III |
| Rez. 1 Mannit | > 99 % | 91 % | 36 % | 86 % | 47 % | 27 % |
| Rez. 2 Lactose | > 99 % | > 99 % | 18 % | > 99 % | > 99 % | 12 % |
| Rez. 3 Maltose | > 99 % | > 99 % | 6 % | > 99 % | > 99 % | 7,8 % |

- I Reinheit unverändertes Protein in RP HPLC
 II Reinheit unverändertes Protein in SEC HPLC
 III Dimeren/Aggregate in Western Blot

Tabelle 1b: Lagerung bei 40 °C

| | Lagerung 6 Wochen bei 40 °C | | | Lagerung 13 Wochen bei 40 °C | | |
|-----------------------|--------------------------------|--------|-------|---------------------------------|--------|------------------------------------|
| | I | II | III | I | II | III |
| Rez. 1 Mannit | 81 % | 70 % | 50 % | 69 % | 25 % | 70 % |
| Rez. 2 Lactose | > 99 % | > 99 % | 37 % | > 99 % | > 99 % | nicht auswertbar/ aggregiert |
| Rez. 3 Maltose | > 99 % | > 99 % | 6,4 % | > 99 % | > 99 % | 12 % |

- I Reinheit unverändertes Protein in RP HPLC
 II Reinheit unverändertes Protein in SEC HPLC
 III Dimeren/Aggregate in Western Blot

Beispiel 3:

Es wurden Lyophilisate von GCSF hergestellt. Dazu wurden die in nachfolgender Tabelle genannten Hilfsstoffe in Wasser für Injektionszwecke gelöst, danach wurde G-CSF in einer Konzentration von 70 µg/ml zugefügt und ggf. wurde mit geringen Mengen des Puffersystems der pH-Wert genau eingestellt. Pluronic F 68 wurde als ein Vertreter eines entsprechend geeigneten Tensides verwendet. Andere Tenside verhalten sich ähnlich. Nach Sterilfiltrationen durch einen geeigneten 0,2 µm-Membranfilter wurden die Lösungen in sterile Injektionsflaschen aus Glas der hydrolytischen Klasse I abgefüllt und nach üblichen Verfahren lyophilisiert. Nach der Lyophilisation wurde mit Stickstoff belüftet und die Injektionsflaschen mit Gefriertrocknungsstopfen unter aseptischen Bedingungen verschlossen. Die Zubereitungen wurden in verbördelten Flaschen unter Lichtausschluß bei definierten Lagertemperaturen bei 6 und 12 Wochen gelagert und mit den in Beispiel 1 genannten Methoden untersucht.

Tabelle 2: Maltose-haltige Rezepturen von G-CSF bei pH 3,6

| | Rezeptur 4 | Rezeptur 5 |
|-----------------------------|------------|------------|
| G-CSF | 70 µg | 70 µg |
| Maltose | 35 mg | 35 mg |
| L-Phenylalanin | 10 mg | 10 mg |
| Ascorbinsäure | 5 mg | 5 mg |
| Glutathion | 10 mg | 10 mg |
| L-Glutaminsäure | 5 mg | 5 mg |
| L-Arginin | 10 mg | 10 mg |
| Puffer (pH) | ad pH 3,6 | ad pH 3,6 |
| Pluronic F 68 | - | 0,1 mg |
| Wasser für Injektionszwecke | ad 1 ml | ad 1 ml |

Tabelle 3: Lagerung bei 20 °C

| Rp. | Lager-temp. | nach 6 Wochen | nach 12 Woche | nach 6 Wochen | | nach 12 Wochen | |
|-----|-------------|---------------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| | | Aggr. in % | Aggr. in % | SEC % G-CSF | RP % G-CSF | SEC % G-CSF | HPLC % G-CS |
| 4 | + 20 °C | 0,0 | 2,6 | 61 | 63 | 64 | 69 |
| 5 | + 20 °C | 0,0 | 0,5 | > 99 | > 99 | > 99 | > 99 |

Beispiel 4:

G-CSF-Lyophilisate mit 500 µg/ml G-CSF (Rezepturen 6 - 10) wurden wie folgt hergestellt. Die in nachfolgender Tabelle genannten Hilfsstoffe wurden in Wasser für Injektionszwecke gelöst, GCSF wurde zugegeben und, falls nötig, wurde der pHWert mit geringen Mengen Salzsäure oder oder Di-Natrium-hydrogenphosphat einjustiert. Jeweils 1 ml der zuvor durch ein 0,2µm-Membranfilter sterilfiltrierten Lösungen wurde in Injektionsflaschen aus Glas der hydrolytischen Klasse I abgefüllt und nach üblichen Verfahren gefriergetrocknet. Nach der Lyophilisation wurde mit Stickstoff belüftet und die Lyophilisate wurden mit Gefriertrocknungsstopfen unter aseptischen Bedingungen verschlossen. Die verbördelten Lyophilisate wurden unter Lichtausschluß bei definierten Temperaturen gelagert und mit den in Beispiel 1 genannten Methoden untersucht.

Tabelle 4: Zusammensetzungen der Rezepturen 6 - 10

| | Rez. 6 | Rez. 7 | Rez. 8 | Rez. 9 | Rez. 10 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| G-CSF | 0,5 µg | 0,5 µg | 0,5 µ | 0,5 µg | 0,5 µg |
| Maltose | 35 mg | 35 mg | 35 mg | - | - |
| L-Phenylalanin | 10 mg | 10 mg | 10 mg | 10 mg | 10 mg |
| Ascorbinsäure | 5 mg | - | - | 5 mg | - |

| | Rez. 6 | Rez. 7 | Rez. 8 | Rez. 9 | Rez. 10 |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Glutathion | 10 mg | - | - | 10 mg | - |
| L-Glutaminsäure | 5 mg | - | - | 5 mg | - |
| L-Arginin | 10 mg | 10 mg | 10 mg | 10 mg | 10 mg |
| Puffer (pH) | ad 4,5 | ad 4,5 | ad 6,5 | ad 4,5 | ad 6,5 |
| Pluronic F68 | 0,1 mg | 0,1 mg | 0,1 mg | 0,1 mg | 0,1 mg |
| Wasser für Injektionszw. | ad 1 ml | ad 1 ml | ad 1 ml | ad 1 ml | ad 1 ml |

Tabelle 5: Analysenergebnisse

| Rez. | Lager-temp. | Western Blot | | nach 6 Wochen | | | nach 13 Wochen | | |
|------|-------------|---------------|----------------|---------------|---------|------------|----------------|---------|------------|
| | | 6 Wo. % Aggr. | 12 Wo. % Aggr. | SEC % G-CSF | % Aggr. | RP % G-CSF | SEC % G-CSF | % Aggr. | RP % G-CSF |
| 6 | + 8 °C | < 1 | 1,0 | > 99 % | 0,9 | > 99 % | > 99 % | 0,7 | 99 % |
| | + 40 °C | < 1 | 1,7 | > 99 % | 0,6 | > 99 % | > 99 % | 0,6 | 98 % |
| 7 | + 8 °C | < 1 | 1,1 | > 99 % | 1,6 | > 99 % | > 99 % | 1,1 | 99 % |
| | + 40 °C | < 1 | 2,3 | > 99 % | 1,9 | > 99 % | > 99 % | 1,1 | 99 % |
| 8 | + 8 °C | < 1 | - | | | | > 98 % | 1,5 | > 99 % |
| | + 40 °C | < 1 | - | | | | > 98 % | 1,4 | > 99 % |
| 9 | + 8 °C | 3,8 | 0,3 | 95 % | 5,8 | > 99 % | 95 % | 1,5 | 98 % |
| | + 40 °C | 7,9 | 2,5 | 95 % | 6,4 | 93 % | 86 % | 0,8 | 94 % |
| 10 | + 8 °C | - | 5,2 | | | | 96 % | 1,0 | 95 % |
| | + 40 °C | - | 10,3 | | | | 89 % | 2,6 | 89 % |

Beispiel 5:

Die in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Formulierungen (Rezepturen 11 - 14) wurden wie folgt hergestellt: Die Hilfsstoffe wurden in Wasser für Injektionszwecke gelöst, danach G- CSF in der angegebenen Konzentration zugefügt. Falls notwendig, wurde der pH mit Hilfe der Komponenten des Phosphatpuffers genau einjustiert. Die Lösungen wurden sodann durch einen sterilisierten Membranfilter der Porenweite 0,2 μ m filtriert und unter aseptischen Bedingungen in Injektionsflaschen der hydrolytischen Klasse I abgefüllt und lyophilisiert. Nach der Lyophilisation wurde mit Stickstoff belüftet, die Lyophilisate wurden mit Gefriertrocknungsgummistopfen unter aseptischen Bedingungen verschlossen und verbördelt. Die Lyophilisate wurden unter Lichtausschluß bei definierten Lagertemperaturen belastet. Nach 6 und 13 Wochen wurden Untersuchungen gemäß der in Beispiel 1 angegebenen Methoden durchgeführt.

Tabelle 6: Aminosuckerhaltige Lyophilisatzubereitungen

| | Rez. 11 | Rez. 12 | Rez. 13 | Rez. 14 |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| G-CSF | 0,5 μ g | 0,5 μ g | 0,5 μ g | 0,5 μ g |
| Pluronic F68 | 0,1 mg | 0,1 mg | 0,1 mg | 0,1 mg |
| N-methyl-glucosamin | - | 10 mg | - | 10 mg |
| Galactosamin | 10 mg | - | 10 mg | - |
| Glycin | - | - | 35 mg | 35 mg |
| Maltose | 35 mg | 35 mg | - | - |
| Phenylalanin | 10 mg | - | - | - |
| Phosphatpuffer | ad pH 7,0 | ad pH 7,0 | ad pH 7,0 | ad pH 7,0 |
| Wasser für Injektionszwecke | ad 1,0 ml | ad 1,0 ml | ad 1,0 ml | ad 1,0 ml |

Die nach Lagerung der o. g. Zubereitung erhaltenen Analysendaten sind in nachfolgender Ergebnistabelle zusammengefaßt.

Tabelle 7: Analysenergebnisse
ZSP = Zersetzungsprodukte

| Rez. | Lagerung | 6 Wochen West. Blot. % Aggr. | 12 Wochen West. Blot. % Aggr. | 12 Wochen | |
|------|----------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------|
| | | | | RP-HPLC % G-CSF | % ZSP in SEC HPLC |
| 11 | + 8 °C | 3,8 | 2,9 | > 99 | 1,2 |
| | + 40 °C | 3,2 | 2,3 | > 99 | 1,8 |
| 12 | + 8 °C | 1,8 | 3,8 | > 99 | 1,4 |
| | + 40 °C | 1,7 | 4,5 | > 99 | 0,7 |
| 13 | + 8 °C | 1,1 | 1,4 | > 99 | 0,9 |
| | + 40 °C | 16,8 | 13,0 | 75 | 4,2 |
| 14 | + 8 °C | 1,6 | 12,4 | 97,5 | 1,2 |
| | + 40 °C | 7,7 | 26,3 | 84,5 | 3,5 |

Beispiel 6:

Die nachfolgend beschriebenen Rezepturen 15 und 16 wurden wie folgt hergestellt: Die angegebenen Hilfsstoffe wurden in Wasser für Injektionszwecke gelöst, G-CSF in der angegebenen Konzentration wurde zugefügt. Der pH wurde, falls notwendig, mit Anteilen der Pufferkomponenten einjustiert. Danach wurde die Lösung durch einen sterilisierten Membranfilter der Porenweite 0,2 µm filtriert und unter aseptischen Bedingungen in sterile Injektionsflaschen aus Glas der hydrolytischen Klasse I abgefüllt. Nachfolgend wurden die Injektionszubereitungen gefriergetrocknet, danach wurde mit Stickstoff belüftet und die Injektionsflaschen wurden unter aseptischen Bedingungen mit einem Gefriertrocknungsstopfen verschlossen und danach verbördelt. Die Zubereitungen wurden unter Lichtausschluß bei definierten Temperaturen gelagert und auf die nachfolgend genannten Parameter hin untersucht. Dabei wurden die in Beispiel 1 beschriebenen Untersuchungsmethoden angewandt.

Rezeptur 15Rezeptur 16

| | | | |
|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| G-CSF | 0,25 mg | G-CSF | 0,3 mg |
| Polysorbat 80 | 0,05 mg | Polysorbat 80 | 0,1 mg |
| Phenylalanin | 5 mg | Mannit | 50 mg |
| Maltose | 17,5 mg | Puffer | ad pH 4,5 |
| L-Arginin | 5 mg | Wasser f. Injektionszw. | ad 1,0 ml |
| Puffer | ad pH 4,5 | | |
| Wasser f. Injektionszw. | ad 0,5 ml | | |

Tabelle 8: Untersuchungsergebnisse nach Lagerung von
Rezeptur 15 und 16 über 3 und 6 Monate

| | Rezeptur 15 | | | | Rezeptur 16 | | | |
|-------------------------|-----------------------|--------|-----------------------|-------|-----------------------|--------|-----------------------|------|
| | Lagerzeit 3 Monate | | Lagerzeit 6 Monate | | Lagerzeit 3 Monate | | Lagerzeit 6 Monate | |
| | 4-8 °C | 23 °C | 4-8 °C | 23 ° | 4-8 °C | 23 °C | 4-8 °C | 23 ° |
| West. Blot (Dimere) | 2,2 | < 1 % | 1,3 % | 0,7 | < 1 % | 12 % | 4,1 % | 17 |
| SEC-HPLC (Dimere) | < 1 % | < 1 % | < 1 % | < 1 % | < 1 % | 2 % | < 1 % | 3 |
| RP-HPLC (G-CSF Peak) | > 99 % | > 99 % | > 98 % | > 98 | > 99 % | 98,2 % | > 98 % | > 98 |

Beispiel 7:

Die in Tabelle 9 beschriebenen Formulierungen wurden wie folgt hergestellt:

Die angegebenen Hilfsstoffe wurden in Wasser für Injektionszwecke gelöst, G-CSF wurde in der angegebenen Konzentration zugegeben, danach wurde, falls notwendig, der pHWert mit kleinen Anteilen der Pufferkomponenten einjustiert. Die Arzneistofflösung wurde dann durch einen sterilisierten Membranfilter der Porenweite 0,2 µm sterilfiltriert, danach unter aseptischen Bedingungen in sterilisierte Injektionsflaschen aus Glas der hydrolytischen Klasse I abgefüllt und lyophilisiert.

Nach der Lyophilisation wurde mit Stickstoff belüftet und die Flaschen wurden unter aseptischen Bedingungen mit Gefriertrocknungsstopfen verschlossen. Die Flaschen wurden verbördelt und unter Lichtausschluß und definierten Temperaturbedingungen gelagert. Nach den entsprechenden Lagerzeiten wurden mit den in Beispiel 1 beschriebenen Methoden analytische Untersuchungen durchgeführt (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 9: G-CSF Lyophilisate mit Maltose im Vergleich zu anderen Gerüstbildern

| | Rez. 17 | Rez. 18 | Rez. 19 | Rez. 20 | Rez. 21 | Rez. 22 | Rez. 23 | Rez. 24 |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| G-CSF | 350 µg | 350 µg | 175 µg | 175 µg | 175 µg | 175 µg | 175 µg | 175 µg |
| Maltose | | | 17,5 mg | 17,5 mg | 17,5 mg | - | - | - |
| Glycin | | | | | | 4 mg | 10 mg | 8,9 mg |
| Arginin | | | 5 mg | - | 5 mg | 5 mg | - | - |
| Phenylalanin | | | 5 mg | 5 mg | 5 mg | 5 mg | - | 2,5 mg |
| Mannit | 50 mg | 50 mg | | | | - | - | - |
| Tween 80 | 0,1 mg | 0,1 mg | 0,05 mg | 0,05 mg | 0,05 mg | 0,05 mg | 0,05 mg | 0,05 mg |
| pH | 4,5 | 7,2 | 4,5 | 7,2 | 7,2 | 7,2 | 7,2 | 7,2 |
| (Puffer) | HCl | Phosphat | HCl | HCl | HCl | HCl | Phosphat | Phosphat |
| Wasser für Injektionszwecke | ad 1,0 ml | ad 1,0 ml | ad 0,5 ml | ad 0,5 ml | ad 0,5 ml | ad 0,5 ml | ad 0,5 ml | ad 0,5 ml |

Tabelle 10 sind die erhaltenen Analysendaten für die genannten Rezepturen zusammengefaßt:

| Rezeptur | Lagerung | 4 Wochen | | 4 Wochen Western Blot |
|----------|----------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| | | RP-HPLC % G-CSF | SEC-HPLC % G-CSF | |
| 17 | 8 °C | > 99 | > 99 | 3,6 % Dimere |
| | 30 °C | 94 | 92 | 9,6 % Dimere |
| | 40 °C | | | 14,4 % Dimere |
| 18 | 8 °C | 69 | 60 | Aggregate |
| | 30 °C | 44 | 36 | Aggregate |
| | 40 °C | 13 | 12 | Aggregate |
| 19 | 8 °C | > 99 | > 99 | 1,0 % Dimere |
| | 30 °C | > 99 | 95,5 | 0,5 % Dimere |
| | 40 °C | > 99 | 97,5 | 0,5 % Dimere |
| 20 | 8 °C | > 99 | > 99 | 1,6 % Dimere |
| | 30 °C | > 99 | > 99 | 1,4 % Dimere |
| | 40 °C | > 99 | > 99 | 2,3 % Dimere |
| 21 | 8 °C | > 99 | > 99 | 1,5 % Dimere |
| | 30 °C | > 99 | 97,5 | 2,1 % Dimere |
| | 40 °C | > 99 | 97 | 2,0 % Dimere |
| 22 | 8 °C | > 99 | > 99 | 2,8 % Di/Aggregat |
| | 30 °C | 96 | 96 | 3,0 % Di/Aggregat |
| | 40 °C | | | 12 % Di/Aggregate |
| 23 | 8 °C | > 99 | > 99 | 6,8 % Dimere |
| | 30 °C | 91,5 | 92 | Aggregate |
| | 40 °C | 79 | 74 | Aggregate |
| 24 | 8 °C | > 99 | > 99 | 10,8 % Dimere |
| | 30 °C | 88 | 85 | Aggregate |
| | 40 °C | 67 | 60 | Aggregate |

Beispiel 8:

Standzeit erfindungsgemäßer wiederaufgelöster Lyophilisate mit pH 7,4

Es wurde folgende Zusammensetzung hergestellt:

| mg/ml | Rezeptur 25 |
|---------------|-------------|
| | |
| G-CSF | 0,35 |
| Polysorbat 80 | 0,1 |
| Maltose | 50 |
| Arginin | 10 |
| Phenylalanin | 10 |
| Salzsäure | ad pH 7,4 |

Die genannten Hilfsstoffe wurden in 1 ml Wasser für Injektionszwecke gelöst, G-CSF wurde zugefügt und der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen sterilisierten Membranfilter der Porenweite 0,2 µm sterilfiltriert und danach in Injektionsflaschen der hydrolytischen Klasse 1 abgefüllt.

Nach dem Aufsetzen geeigneter Gefriertrocknungsstopfen wurde die Zubereitung bei einer Haupttrocknungstemperatur von - 25 °C und einer Nachtrocknungstemperatur von + 8 °C bis zu einer Restfeuchte von < 5 % gefriertrocknet. Die getrockneten Lyophilisate wurden mit Stickstoff belüftet und verschlossen.

Nach 6monatiger Lagerung bei 4 - 8 °C wurden die Lyophilisate mit 1 ml Wasser für Injektionszwecke aufgelöst und danach 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen.

Nach dieser Standzeit zeigte sich mit den in Beispiel 1 beschriebenen Untersuchungsmethoden zur biologischen Wirksamkeit (NFS-60 Test), Proteingehalt (Photometrie OD 280) und Reinheit (Western Blot), Reinheit (SEC HPLC), Reinheit

(SDS Page) und Reinheit (RP HPLC) keine Veränderung gegenüber den unmittelbar nach dem Auflösen untersuchten Proben. Auch Trübungsmessungen - selbst unter mechanischer Belastung - ergaben sehr niedrige Trübungswerte.

Damit wird deutlich, daß wiederaufgelöste Lyophilisate der erfindungsgemäßen Rezeptur mit Maltose und Argininpuffer bei pH 7,4 eine für die klinische Anwendung ausreichende Standzeit besitzen.

Beispiel 9:

Stabilität erfindungsgemäßer Lyophilisate, die Maltose, Raffinose, Saccharose oder Trehalose enthalten, nach 13-wöchiger Lagerung bei 40 °C

Gemäß Beispiel 8, Rezeptur 25, wurden drei Lyophilisate hergestellt, die 50 mg/ml Maltose oder die gleiche Gewichtsmenge von a) Raffinose oder b) Saccharose oder c) Trehalose enthielten.

Alle Lyophilisate wurden 13 Wochen bei Temperaturen von 5 °C, 25 °C, 30 °C und 40 °C eingelagert, danach aufgelöst und visuell und mit den in Beispiel 1 beschriebenen Untersuchungsmethoden SEC HPLC, RP HPLC, Western Blot und SDS Page untersucht.

In allen Fällen ergaben sich klare farblose Lösungen. In der SEC HPLC betrug die Größe der Produktpeaks > 98 % und die der Dimeren/Aggregate < 1 %. In der RP HPLC erreichte der Produktpeak 100 %, Nebenpeaks waren nicht nachweisbar, der Hauptpeak entsprach dem Arbeitsstandard. Im SDS-Page waren keine Abbauprodukte, Dimere oder Aggregate nachweisbar.

Tabelle: nach 13 Wochen Lagerzeit

| Temp. | SEC HPLC % G-CSF | RP HPLC % G-CSF | Western Blot % Aggregate | SDS-Page % Nebenbande |
|-------|---------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 5 °C | > 98 % | 100 % | n.n. | < 1 |
| 20 °C | > 98 % | 100 % | n.n. | < 1 |
| 30 °C | > 98 % | 100 % | n.n. | < 1 |
| 40 °C | > 98 % | 100 % | n.n. | < 1 |

Beispiel 10:

Stabilität erfindungsgemäßer Maltose-Lyophilisate mit Argininphosphat- und Argininchloridpuffern mit pH 4,5 und pH 7,2 nach 13-wöchiger Lagerung bei 30 °C

Gemäß der in Beispiel 8 beschriebenen Herstellung wurden die folgenden Rezepturen, die sich lediglich durch Puffer und pH-Wert unterscheiden, hergestellt:

| | Rezeptur 26 | Rezeptur 27 | Rezeptur 28 | Rezeptur 29 |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| G-CSF | 0,35 mg | 0,35 mg | 0,35 mg | 0,35 mg |
| Polysorbat 80 | 0,1 mg | 0,1 mg | 0,1 mg | 0,1 mg |
| Phenylalanin | 10 mg | 10 mg | 10 mg | 10 mg |
| Arginin | 10 mg | 10 mg | 10 mg | 10 mg |
| Maltose | 47,5 mg | 47,5 mg | 47,5 mg | 47,5 mg |
| Phosphorsäure | ad pH 4,5 | ad pH 7,2 | | |
| Salzsäure | | | ad pH 4,5 | ad pH 7,2 |

Die Zubereitungen wurden bei Temperaturen von 4 bis 8 °C, 20 - 25 °C sowie 30 °C eingelagert, nach 13 Wochen in 1 ml Wasser für Injektionszwecke aufgelöst und mit den in Beispiel 1 beschriebenen Untersuchungsmethoden RP HPLC, SEC HPLC (Reinheit) und Western Blot (Abbau, Dimerisation und Aggregatbildung) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt und zeigen, daß die erfindungsgemäßen Lyophilisate mit pH 4,5 und 7,2 auch nach 13-wöchiger Lagerung bei 30 °C stabil sind.

Tabelle 11: Ergebnisse nach 13 Wochen 30 °C

| | RP-HPLC | SEC HPLC | Western Blot | | |
|-------------|--------------|----------|--------------|--------|----------|
| | % Nebenpeaks | | Abbau | Dimere | Aggregat |
| Rezeptur 26 | < 1 | < 1 | n.n. | n.n. | n.n. |
| Rezeptur 27 | < 1 | < 1 | n.n. | n.n. | n.n. |
| Rezeptur 28 | < 1 | < 1 | n.n. | < 1 % | n.n. |
| Rezeptur 29 | < 1 | < 1 | n.n. | < 1 % | n.n. |

n.n. = nicht nachweisbar

Beispiel 11:

Stabilität erfindungsgemäßer Maltose-Lyophilisate mit Argininphosphat- und Argininchloridpuffer mit pH 7,4 nach 4- und 13-wöchiger Lagerung bei 40 °C

Es wurden in gleicher Weise wie in Beispiel 8 Rezepturen hergestellt und deren pH-Wert einmal mit Salzsäure und einmal mit Phosphorsäure auf 7,4 eingestellt:

| | Rezeptur 30 | Rezeptur 31 |
|---------------|-------------|-------------|
| G-CSF | 0,35 mg | 0,35 mg |
| Polysorbat 80 | 0,1 mg | 0,1 mg |
| Phenylalanin | 10 mg | 10 mg |
| Arginin | 10 mg | 10 mg |
| Maltose | 47,5 mg | 47,5 mg |
| Phosphorsäure | pH 7,4 | |
| Salzsäure | | pH 7,4 |

Diese zwei Zubereitungen wurden bei Temperaturen von 4 - 8 °C sowie 40 °C 4 und 13 Wochen eingelagert. Die Untersuchungsergebnisse (Western Blot, SDS-Page) nach 13 Wochen Lagerung sind in nachfolgender Tabelle 12 dargestellt. Die Ergebnisse nach 4-wöchiger Lagerung sind identisch.

Die Ergebnisse belegen, daß die erfindungsgemäßen Maltose-Lyophilisate mit pH 7,4 auch nach 13-wöchiger Lagerung bei 40 °C stabil sind.

Tabelle 12: Ergebnisse nach 13 Wochen 40 °C

| | Lager temp. | Western Blot, nicht reduz. | | SDS-Page, reduz. | | | Rest-feuchte % |
|-------------|-------------|----------------------------|-----------------|------------------|-------------|------------|----------------|
| | | Aggr. < 1 % | Dimere < 2 % | Produkt-Bd. | Abbau-prod. | Zusatz-bd. | |
| Rezeptur 30 | 5 °C | n.n. | n.n. | < 98 % | < 1 % | n.n. | 1,4 |
| | 40 °C | n.n. | n.n. | < 98 % | < 1 % | n.n. | 2,0 |
| Rezeptur 31 | 5 °C | n.n. | n.n. | < 98 % | < 1 % | n.n. | 1,9 |
| | 40 °C | n.n. | n.n. | < 98 % | < 1 % | n.n. | 2,1 |

Beispiel 12:

Stabilität erfindungsgemäßer Lyophilisate mit pH 7,4 und G-CSF-Konzentrationen von 0,5 und 1,0 mg/ml nach 13-wöchiger Lagerung bei 40 °C

Gemäß der in Beispiel 8 beschriebenen Herstellung wurden die folgenden Rezepturen, die sich im G-CSF-Gehalt unterscheiden, hergestellt:

| mg/ml | Rezeptur 32 | Rezeptur 33 |
|---------------|-------------|-------------|
| G-CSF | 0,5 mg | 1,0 mg |
| Polysorbat 80 | 0,1 mg | 0,1 mg |
| Phenylalanin | 10 mg | 10 mg |
| Arginin | 10 mg | 10 mg |
| Maltose | 47,5 mg | 47,5 mg |
| Phosphorsäure | pH 7,4 | pH 7,4 |

Die Zubereitungen wurden bei - 20 °C, 4 - 8 °C, 20 °C - 25 °C, 30 °C und 40 °C 4 Wochen und 13 Wochen gelagert, danach in 1 ml Wasser für Injektionszwecke aufgelöst und mit den in Beispiel 1 beschriebenen Untersuchungsmethoden SEC HPLC, RP HPLC, Western Blot und SDS Page untersucht (Untersuchungsergebnisse siehe Tabelle 13).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Lyophilisate der erfindungsgemäßen Rezepturen auch bei höherer Proteinkonzentration bis zu 1 mg/ml nach 13-wöchiger Lagerung bei 40 °C stabil sind.

Beispiel 14 :**Langzeitstabilität über 9 Monate**

Es wurden Lyophilisate gemäß der Rezeptur 31 nach Beispiel 11 hergestellt und die Zubereitungen bei Temperaturen von - 20 °C, 5 °C, 25 °C, 30 °C und 40 °C über 9 Monate gelagert und nach 3, 6 und 9 Monaten mit allen in Beispiel 1 beschriebenen Untersuchungsmethoden untersucht.

In allen geprüften Parametern war im Laufe der Lagerzeit keine Veränderung nachweisbar. Die Zubereitung erwies sich am Ende der Lagerzeiten bei allen Temperaturen als biologisch voll wirksam, wies den vollen Proteingehalt auf und zeigte in allen Reinheitsbestimmungen Banden bzw. Peaks, die weit unter 1 % des intakten G-CSF-Moleküls lagen.

Die Ergebnisse belegen, daß die erfindungsgemäßen Lyophilisate langfristig auch bei höheren Temperaturen stabil sind und somit die im Stand der Technik beschriebenen Stabilitäten bei weitem übertreffen.

Tabelle 14: Lagerung bei 30 °C

| | 3 Monate | 6 Monate | 9 Monate |
|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| NFS 60 Test 80 - 125 % | entspricht | entspricht | entspricht |
| OD 280 | 358 mg | 360 mg | 352 mg |
| SDS Page Nebenbande | < 1 % | < 1 % | < 1 % |
| Western Blot % Aggr. % Dimere | n.n. < 1 % | n.n. < 1 % | n.n. < 1 % |

| | 3 Monate | 6 Monate | 9 Monate |
|-------------------------|----------|----------|----------|
| | | | |
| RP HPLC Produktpeak | > 99 % | > 99 % | > 99 % |
| SEC HPLC Produktpeak | > 98 % | > 98 % | > 98 % |
| Nebenpeaks | n.n. | n.n. | n.n. |
| Trübungsmessung TE/F | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

Tabelle 13:

Rezeptur 33

Rezeptur 32

| Rezeptur 32 | | | | | | | | | | | | |
|--|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Prüfparameter | 0 Wo [KS] | 13 Wo [-20°C] | 13 Wo [KS] | 13 Wo [RT] | 13 Wo [30 °C] | 13 Wo [40 °C] | 0 Wo [KS] | 13 Wo [-20°C] | 13 Wo [KS] | 13 Wo [RT] | 13 Wo [30 °C] | 13 Wo [40 °C] |
| Visuelle Prüfung - Aussehen Lyophilisat - Klarheit, (Lösung) | - - | weiß klar, | weiß klar, | weiß klar, | weiß klar, | weiß klar, | - - | weiß klar, | weiß klar, | weiß klar, | weiß klar, | weiß klar, |
| SEC-HPLC [Reinheit %] [Dimere/Aggregate %] | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 |
| RP-HPLC [Reinheit %] [Summe der Nebenpeaks %] | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 | > 98 < 1 |
| Western-Blot [Dimere %] [Aggregate %] [Abbauprodukte %] | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. | n.n. n.n. n.n. |
| SDS-PAGE, silver stain [Monomer %] [Zusatzbanden %] [Abbauprodukte %] | - - - | >> 99% n.n. << 1% | >> 99% n.n. << 1% | >> 99% n.n. << 1% | >> 99% n.n. << 1% | >> 99% n.n. << 1% | - - - | >> 99% n.n. << 1% | >> 99% n.n. << 1% | >> 99% n.n. << 1% | >> 99% n.n. << 1% | >> 99% n.n. << 1% |

n.n. = nicht nachweisbar

Patentansprüche

1. Lyophilisierte pharmazeutische Zubereitung von G-CSF, enthaltend Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Aminosucker.
2. Lyophilisierte Zubereitung gemäß Anspruch 1, enthaltend zusätzlich eine physiologisch verträgliche Menge an Tensiden, die kleiner als oder maximal gleich der eingesetzten Proteinmenge an G-CSF ist.
3. Lyophilisierte Zubereitung gemäß Anspruch 2, enthaltend 0,5 mg/ml, vorzugsweise 0,01 - 0,1 mg/ml Tenside.
4. Lyophilisierte Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, enthaltend zusätzlich eine physiologisch verträgliche Menge an Aminosäuren.
5. Lyophilisierte Zubereitung gemäß Anspruch 4, enthaltend Arginin und/oder Phenylalanin.
6. Lyophilisierte Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, enthaltend physiologisch verträgliche Hilfsstoffe ausgewählt aus der Gruppe der Antioxidantien, Komplexbildner, Puffer, Säuren, Basen oder Isotonisierungsmittel.
7. Lyophilisierte Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 enthaltend Phosphat- oder Acetatpuffer.
8. Lyophilisierte Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 - 6, enthaltend Argininphosphat-, Argininchlorid- oder Arginincitratpuffer, vorzugsweise mit einem pH-Wert von 7 - 8.

9. Lyophilisierte Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen frei sind von proteinartigen Hilfsstoffen oder polymeren Hilfsstoffen.
10. Wässrige pharmazeutische Zubereitung, erhältlich durch Redissolution des Lyophilisates gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Wässrige pharmazeutische Zubereitung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung einen pH-Wert von 6,5 - 8 oder 3 - 5 aufweist, vorzugsweise einen pH-Wert von 7,0 - 7,5.
12. Verfahren zur Herstellung einer lyophilisierten pharmazeutischen Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß man eine wässrige Zubereitung, enthaltend G-CSF als Wirkstoff und Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Aminozucker als Hilfsstoffe sowie ggf. weitere pharmazeutische Hilfsstoffe, herstellt und die Lösung anschließend lyophilisiert.
13. Verwendung von Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Aminozucker zur Herstellung einer stabilen lyophilisierten pharmazeutischen Zubereitung, enthaltend G-CSF als Wirkstoff.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. national Application No

PCT/EP 93/03543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 5 A61K37/02 A61K9/14 A61K47/18 A61K47/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | DE,A,37 23 781 (CHUGAI SEIYAKU K.K.) 21 January 1988 cited in the application see claims 1-5,10-13 see page 4, line 30 - line 54 see page 4, line 57 - line 65 see page 5, line 16 - line 19 see page 5, line 31 - line 33 see examples | 1-7,12,13 |
| Y | EP,A,0 373 679 (AMGEN INC.) 20 June 1990 cited in the application see claims see page 4, line 23 see page 4, line 35 - line 43 --- -/-- | 1-13 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 1994

Date of mailing of the international search report

09.03.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarponi, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No
PCT/EP 93/03543

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P,Y | EP,A,0 528 314 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 February 1993 cited in the application see claims 1,3,5,11,13 see page 4, line 26 - line 33 see page 4, line 43 - line 51 see page 5, line 12 - line 17 see page 5, line 40 - line 44 --- | 1-13 |
| P,Y | EP,A,0 528 313 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 February 1993 cited in the application see claims 1,8,10,13 see page 5, line 45 - line 47 see page 5, line 51 - line 53 see page 6, line 40 - line 45 see page 6, line 54 - line 57 see page 8, line 1 - line 2 --- | 1-13 |
| P,X | WO,A,93 13752 (SRI INTERNATIONAL) 22 July 1993 see claims 11-14 see page 3, line 19 see page 4, line 9 - line 12 see example 3 ----- | 1,2,4, 12,13 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. Application No

PCT/EP 93/03543

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE-A-3723781 | 21-01-88 | AU-B- 611856 | 27-06-91 |
| | | AU-A- 7566587 | 21-01-88 |
| | | BE-A- 1000253 | 27-09-88 |
| | | CH-A- 671157 | 15-08-89 |
| | | FR-A- 2601591 | 22-01-88 |
| | | GB-A, B 2193631 | 17-02-88 |
| | | JP-A- 63146826 | 18-06-88 |
| | | NL-A- 8701640 | 16-02-88 |
| | | SE-A- 8702907 | 19-01-88 |
| | | JP-A- 63146827 | 18-06-88 |
| | | JP-A- 63152326 | 24-06-88 |
| | | JP-A- 63146828 | 18-06-88 |
| EP-A-0373679 | 20-06-90 | US-A- 5104651 | 14-04-92 |
| | | AU-B- 621695 | 19-03-92 |
| | | AU-A- 4668989 | 10-07-90 |
| | | CA-A- 2005143 | 16-06-90 |
| | | JP-T- 3502808 | 27-06-91 |
| | | WO-A- 9006762 | 28-06-90 |
| EP-A-0528314 | 24-02-93 | DE-A- 4126984 | 18-02-93 |
| | | AU-A- 2405292 | 16-03-93 |
| | | WO-A- 9303745 | 04-03-93 |
| EP-A-0528313 | 24-02-93 | DE-A- 4126983 | 18-02-93 |
| | | AU-A- 2409492 | 16-03-93 |
| | | WO-A- 9303744 | 04-03-93 |
| WO-A-9313752 | 22-07-93 | NONE | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/03543

| A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 5 A61K37/02 A61K9/14 A61K47/18 A61K47/26 | | |
|--|--|---|
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK | | |
| B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 5 A61K | | |
| Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen | | |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) | | |
| C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | DE,A,37 23 781 (CHUGAI SEIYAKU K.K.) 21. Januar 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1-5,10-13 siehe Seite 4, Zeile 30 - Zeile 54 siehe Seite 4, Zeile 57 - Zeile 65 siehe Seite 5, Zeile 16 - Zeile 19 siehe Seite 5, Zeile 31 - Zeile 33 siehe Beispiele | 1-7, 12, 13 |
| Y | EP,A,0 373 679 (AMGEN INC.) 20. Juni 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche siehe Seite 4, Zeile 23 siehe Seite 4, Zeile 35 - Zeile 43 | 1-13 |
| -/-- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie | | |
| Legende: * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen: "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 1. März 1994 | | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 09.03.94 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | | Bevollmächtigter Bediensteter Scarponi, U |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 93/03543

| C-(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| P,Y | EP,A,0 528 314 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24. Februar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,3,5,11,13 siehe Seite 4, Zeile 26 - Zeile 33 siehe Seite 4, Zeile 43 - Zeile 51 siehe Seite 5, Zeile 12 - Zeile 17 siehe Seite 5, Zeile 40 - Zeile 44 --- | 1-13 |
| P,Y | EP,A,0 528 313 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24. Februar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,8,10,13 siehe Seite 5, Zeile 45 - Zeile 47 siehe Seite 5, Zeile 51 - Zeile 53 siehe Seite 6, Zeile 40 - Zeile 45 siehe Seite 6, Zeile 54 - Zeile 57 siehe Seite 8, Zeile 1 - Zeile 2 --- | 1-13 |
| P,X | WO,A,93 13752 (SRI INTERNATIONAL) 22. Juli 1993 siehe Ansprüche 11-14 siehe Seite 3, Zeile 19 siehe Seite 4, Zeile 9 - Zeile 12 siehe Beispiel 3 ----- | 1,2,4, 12,13 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/03543

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE-A-3723781 | 21-01-88 | AU-B- 611856 | 27-06-91 |
| | | AU-A- 7566587 | 21-01-88 |
| | | BE-A- 1000253 | 27-09-88 |
| | | CH-A- 671157 | 15-08-89 |
| | | FR-A- 2601591 | 22-01-88 |
| | | GB-A, B 2193631 | 17-02-88 |
| | | JP-A- 63146826 | 18-06-88 |
| | | NL-A- 8701640 | 16-02-88 |
| | | SE-A- 8702907 | 19-01-88 |
| | | JP-A- 63146827 | 18-06-88 |
| | | JP-A- 63152326 | 24-06-88 |
| | | JP-A- 63146828 | 18-06-88 |
| EP-A-0373679 | 20-06-90 | US-A- 5104651 | 14-04-92 |
| | | AU-B- 621695 | 19-03-92 |
| | | AU-A- 4668989 | 10-07-90 |
| | | CA-A- 2005143 | 16-06-90 |
| | | JP-T- 3502808 | 27-06-91 |
| | | WO-A- 9006762 | 28-06-90 |
| EP-A-0528314 | 24-02-93 | DE-A- 4126984 | 18-02-93 |
| | | AU-A- 2405292 | 16-03-93 |
| | | WO-A- 9303745 | 04-03-93 |
| EP-A-0528313 | 24-02-93 | DE-A- 4126983 | 18-02-93 |
| | | AU-A- 2409492 | 16-03-93 |
| | | WO-A- 9303744 | 04-03-93 |
| WO-A-9313752 | 22-07-93 | KEINE | |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.